

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平9-176010

(43)公開日 平成9年(1997)7月8日

| (51)Int.Cl. ⁶ | 識別記号 | 序内整理番号 | F I | 技術表示箇所 |
|--------------------------|-------|------------------------------------|----------------|--------|
| A 6 1 K 31/35 | A E D | | A 6 1 K 31/35 | A E D |
| | A B C | | | A B C |
| | A B G | | | A B G |
| 31/70 | A D P | | 31/70 | A D P |
| C 0 7 D 311/30 | | | C 0 7 D 311/30 | |
| | | 審査請求 未請求 請求項の数 6 FD (全 9 頁) 最終頁に続く | | |

(21)出願番号 特願平7-352016

(22)出願日 平成7年(1995)12月27日

(71)出願人 000001100
呉羽化学工業株式会社
東京都中央区日本橋堀留町1丁目9番11号
(72)発明者 森野 真嘉
東京都練馬区光が丘3-7-2-207
(72)発明者 白神 俊美
東京都小平市大沼町1-180-1-306
(72)発明者 清輔 洋一
東京都新宿区百人町3-26-1-303
(72)発明者 吉沢 親雄
東京都国立市東2-19-46
(74)代理人 弁理士 森田 塤一

(54)【発明の名称】 HSP60ファミリーに属するタンパク質のフラボノイド含有合成抑制剤

(57)【要約】

【課題】 分子量57キロダルトンから68キロダルトンまでの間の熱ショックタンパク質(HSP60ファミリー)の合成抑制剤を提供する。

【解決手段】 フラボノイドを有効成分として含有する。

【効果】 HSP60ファミリーに属するタンパク質が発症に関与する自己免疫疾患(例えば、I型糖尿病や慢性関節リウマチなど)の患者の生理学的状態を有効に改善させ、前記病気を効果的に治療することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 フラボノイドを有効成分として含有することを特徴とする、分子量57キロダルトンから68キロダルトンまでの間の熱ショックタンパク質の合成抑制剤。

【請求項2】 フラボノイドがケルセチンである、請求項1に記載の分子量57キロダルトンから68キロダルトンまでの間の熱ショックタンパク質の合成抑制剤。

【請求項3】 フラボノイドがカテキン類である、請求項1に記載の分子量57キロダルトンから68キロダルトンまでの間の熱ショックタンパク質の合成抑制剤。

【請求項4】 カテキン類がエピガロカテキンガレート、エピカテキンガレート、エピガロカテキン、エピカテキン及びこれらの異性体からなる群から選んだ化合物の少なくとも1種である、請求項3に記載の分子量57キロダルトンから68キロダルトンまでの間の熱ショックタンパク質の合成抑制剤。

【請求項5】 フラボノイドがルチンである、請求項1に記載の分子量57キロダルトンから68キロダルトンまでの間の熱ショックタンパク質の合成抑制剤。

【請求項6】 フラボノイドがバイカレインである、請求項1に記載の分子量57キロダルトンから68キロダルトンまでの間の熱ショックタンパク質の合成抑制剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、フラボノイドを有効成分として含有する、分子量が57キロダルトン(kD)から68kDまでの間の熱ショックタンパク質群(以下、HSP60ファミリーと称する)に属するタンパク質の合成抑制剤に関する。本発明によるHSP60ファミリーに属するタンパク質の合成抑制剤は、特に、HSP60ファミリーに属するタンパク質の組織内合成を抑制することにより、HSP60ファミリーに属するタンパク質が発症に関与するものと考えられている自己免疫疾患、例えばI型糖尿病、慢性関節リウマチなどの病気の患者の生理学的状態を有效地に改善させ、I型糖尿病や慢性関節リウマチなどの自己免疫疾患を効果的に治療することができる。

【0002】

【従来の技術】近年、自己免疫疾患が大きな問題となっている。自己免疫疾患とは、本来ならば自己の身体を構成する成分に対しては攻撃しないはずの免疫系が、自己の組織と反応して破壊してしまう病気であり、例えば、I型糖尿病や慢性関節リウマチなどが含まれる。例えば、近年わが国では、経済・社会・文化の発達と、生活水準の向上や生活様式の変化に伴って、糖尿病患者は著しく増加し、病態も重症化、複雑化してきた。糖尿病学の進歩によって、患者の予後は改善したとはいえるが、特有な網膜症、腎症及び神経障害が多発し、加えて動脈硬化も促進され、健康と社会活動に多大な支障をきたしてい

る。糖尿病のうち、I型糖尿病(インスリン依存性糖尿病; insulin-dependent diabetes mellitus; I D D M)の発生率は、多くの国でこの数十年間に数倍に増加し、現在生きているヒトの1%は70才になるまでにI型糖尿病に罹病するものと予想されている。

【0003】I型糖尿病は、インスリン産生細胞である膵臓ランゲルハンス島のβ細胞だけが自己免疫的に破壊されるためにインスリン欠乏状態となる疾患で、臓器特異的な自己免疫疾患である(Atkinson, M. A. et al.: "Sci. Am.", 263: 42-49, 1990; Todd JA.: "Immunol. Today", 11: 122-129, 1990)。I型糖尿病をおこす自己免疫過程は、非常に厳密に膵臓だけに限られており、しばしば大人になる前に発症してくることが多い。I型糖尿病が臨床的に発症するときには、膵島の炎症(膵島炎)があり、インスリンを産生しているβ細胞の大半が特異的に失われる(Atkinson, M. A., et al.: "Sci. Am.", 263: 62-67, 1990)。糖尿病の臨床症状は、β細胞の大部分(おそらく90%以上)が再生できない程度にまで破壊された後に初めて現れ、患者の生存はインス

20 リンの外的供給に依存することになる。即ち、臨床診断によって発見することができる時期には、この自己免疫反応が既に不可逆的な損傷を与えており、しかもその多くは顕著な自覚症状を示さない等、I型糖尿病は多くの問題を含んでいる。

【0004】また、慢性関節リウマチは、関節滑膜を病変の主座とする慢性炎症性疾患である。病変部位はとくとして関節滑膜のみにとどまらず、全身に及ぶこともまれではない。関節滑膜に初発した炎症は、やがて滑膜増殖、更に軟骨及び骨の破壊を起こし、関節組織の破壊が30引き起こされる。その結果、患者は社会的にも家庭的にも著しく制限を受けるのみならず、経済的負担も無視できないものとなる。慢性関節リウマチの患者数は人口の0.1~0.3%とされる。これは慢性関節リウマチの確診例であって、疑診例などや慢性関節リウマチの周辺疾患を含めると患者数はその10倍前後にも増えるものと思われる。

【0005】一方、熱ショックタンパク質(heat shock protein; HSP、ストレスタンパク質ともいう)は、細胞を何らかのストレス、例えば熱、重金属、薬剤、アミノ酸類似体、又は低酸素(低濃度酸素)などで刺激することにより、細胞に発現される一群のタンパク質である。熱ショックタンパク質は、自然界に普遍的に存在しており、細菌、酵母、植物、昆虫、及びヒトを含む高等動物により産生される。

【0006】HSPは、その種類は多種多様であるが、分子量の大きさからHSP90ファミリー(例えば、90kD又は110kDのHSPなど)、HSP70ファミリー(例えば、70~73kDのHSPなど)、HSP60ファミリー(例えば、57~68kDのHSPなど)、低分子HSPファミリー(例えば、20kD、2

5~28 kD、又は47 kDのHSPなど)の4ファミリーに大別することができる。なお、本明細書においては、特定分子量を有するHSPを、HSPとその直後に記載する数字とによって示すものとし、例えば、分子量60 kDのHSPを『HSP 60』と称するものとする。以上のように、HSPには多くの種類が存在するが、これらは分子量だけでなく、構造、機能、又は性質などもそれぞれ異なるものである。ストレスへの応答に加えて、これらのタンパク質の中には構成的に合成されるものがあり、正常な環境の下で、タンパク質のフォールディング、アンフォールディング、タンパク質サブユニットの会合、タンパク質の膜輸送のような、必須の生理的な役割を演じていることが示されている。熱ショックタンパク質としてのこれらの機能は、分子シャペロンと称される。

【0007】自己免疫疾患の病因に関して注目されていることのひとつに、分子相同性(molecular mimicry)がある。すなわち、自己抗原が微生物などの外来抗原と共通抗原性をもっている場合、微生物感染によって生成される抗体や感作リンパ球が交叉反応によって自己の組織を攻撃してしまう結果、自己免疫疾患が発症するものと考えられている(Atkinson, M. A. et al.: "Sci. Am.", 263: 42-49, 1990; Shinha, A. A. et al.: "Science", 248: 1380-1388, 1990)。例えば、細菌のHSP 60ファミリーに属するタンパク質は、結核、らい病、梅毒、在郷軍人病、又はライム病などの主たる抗原であり(Young, R. A. et al.: "Cell", 59:5-8, 1989)、かつ、細菌のHSP 60ファミリーに属するタンパク質は強い免疫原性を有し、及び自己の(宿主であるヒトの)タンパク質との分子相同性を有するために、感染症がトリガーとなった分子相同性による自己免疫疾患が発症するものと考えられている。

【0008】例えば、糖尿病の患者やその家族の血中に検出される64 kDタンパク質と反応する抗体(64 kD自己抗体)は β 細胞特異的であるし、また糖尿病と診断される直前によく出現しやすい。すなわち、I型糖尿病において発症の原因と考えられている膵島細胞抗原は、分子量64 kDの糖タンパク質(Baekkeskov, S. et al.: "Nature", 298: 167-169, 1982)である。64 kDタンパク質に対する抗体はヒトの糖尿病のみならず(Atkinson, M. A. et al.: "Lancet", 335: 1357-1360, 1990)、B Bラット(Baekkeskov, S. et al.: "Science", 224: 1348-1350, 1984)やNODマウス(Atkinson, M. A. et al.: "Diabetes", 37: 1587-1590, 1988)などのように、自然にI型糖尿病を発症し、ヒトのI型糖尿病の多くの特徴を示す、I型糖尿病のモデル動物においても検出される。I型糖尿病における膵島 β 細胞の64 kDタンパク質は、サイトカインや熱刺激で誘導されるので、熱ショックタンパク質である可能性がある。

【0009】I型糖尿病のモデル動物であるNODマウ

スにおける膵島ランゲルハンス島 β 細胞の64 kDタンパク質は、結核菌(Mycobacterium tuberculosis)のHSP 60ファミリーに属するタンパク質に対する抗体と免疫学的に交叉反応性を示す自己抗原であることが示されている。このように、HSP 60ファミリーに属するタンパク質と64 kDタンパク質自己抗原との間に免疫学的交叉が観察されることにより、膵島 β 細胞の64 kDタンパク質がHSP 60ファミリーの一員である可能性があり、HSP 60ファミリーに属するタンパク質のエピトープと交叉する自己免疫の機序が、I型糖尿病の発症に関与することが示唆されている。また、結核菌のHSP 60ファミリーに属するタンパク質に特異性を有するTリンパ球のクローニングを移入すると、幼若NODマウスにランゲルハンス島炎と高血糖を引き起こす。また、結核菌のHSP 60ファミリーに属するタンパク質を免疫原性のある投与方法、すなわちアジュバントとともにNODマウスに注射すると、糖尿病を早期に発症させ得る(Elias, D. et al.: "Proc. Natl. Acad. Sci. USA", 87: 1576-1580, 1990)。マイコバクテリアのHSP 60ファミリーに属するタンパク質に対する動物の免疫反応がI型糖尿病を引き起こすというこれらの事実は、マイコバクテリアのHSP 60ファミリーに属するタンパク質に対する抗体と交叉反応する抗原に対する免疫系による攻撃が、 β 細胞に障害を与えることを示している。

【0010】また、HSP 60ファミリーに属するタンパク質は、慢性関節リウマチの動物モデルであるラットのアジュバント関節炎や、ヒトのリウマチ関節炎に関連していることが知られている。例えば、慢性関節リウマチの場合、細菌の菌体タンパク質である熱ショックタンパク質のなかでもHSP 60ファミリーに属するタンパク質は、関節軟骨に存在するプロテオグリカンと分子相同性をもっていることが明らかとなっている。ラットのアジュバント関節炎ではHSP 60ファミリーに属するタンパク質反応性Tリンパ球の関与が示されている("Curr. Top. Microbiol. Immunol.", 145: 27-83, 1989)。この疾患は、放射線照射を受けた免疫学的に無防備の(native)ラットに、結核菌のHSP 60ファミリーに属するタンパク質に対して反応性のTリンパ球のクローニングを移入することにより、前記ラットに移すことができる事が見出された("Science", 219: 56-58, 1983; "Nature", 331: 171-173, 1988)。このTリンパ球は同時に関節のプロテオグリカンとも交叉反応性を示す("Proc. Natl. Acad. Sci. USA", 82: 5117-5120, 1985)。このHSP 60ファミリーに属するタンパク質で誘導される調節性Tリンパ球は、溶連菌やプリステインによる関節炎でも認められている。従って、アジュバント関節炎は、抗HSP 60ファミリーに属するタンパク質Tリンパ球により引き起こされる自己免疫疾患のようである。また、ヒトの若年性関節リウマチでもHS

HSP60ファミリーに属するタンパク質反応性Tリンパ球の関与が考えられている。

【0011】また、慢性関節リウマチの患者の滑液中からマイコバクテリア由来のHSP60ファミリーに属するタンパク質に対して、特異的に反応するTリンパ球が取り出されている("Lancet", 11: 478-480, 1988; "Nature", 339: 226, 1989; "Annu. Rev. Immunol.", 1: 1: 637, 1993)。このように、マイコバクテリアのHSP60ファミリーに属するタンパク質と交叉反応性を示すタンパク質が高濃度に慢性関節リウマチの軟骨/パンヌス接合部に認められるのに対し、正常な組織や他の疾患による慢性の炎症を呈する組織においては認められない("Scand. J. Immunol.", 31: 283-288, 1990)。更に、HSP60ファミリーに属するタンパク質に対する抗体がヒト及びラットの慢性関節リウマチで検出される(Kaufmann, S. H. E., et al.: "Immunol. Today", 11: 129-136, 1990)ことからも、慢性関節リウマチの病因がマイコバクテリアのHSP60ファミリーに属するタンパク質と構造の類似した自己抗原に対する自己免疫であるという可能性がある。従ってHSP60ファミリーに属するタンパク質に対する免疫応答の存在はラット及びヒトの両方の関節炎に関連している。

【0012】

【発明が解決しようとする課題】本発明者らは、上記事情に鑑み、I型糖尿病や慢性関節リウマチなどの自己免疫疾患の患者の生理学的状態を有効に改善することができ、それらの自己免疫疾患を効果的に治療することができる方法を開発するために、HSP60ファミリーに属するタンパク質に対して合成抑制作用を示す化合物に関して種々検討を重ねてきた。その結果、本発明者らは、意外にも、フラボノイドが、病態を示す組織の細胞におけるHSP60ファミリーに属するタンパク質の合成を特異的に抑制することを見出した。すなわち、フラボノイドを投与することにより、細胞内のHSP60ファミリーに属するタンパク質の合成が抑制され、従って、I型糖尿病や慢性関節リウマチなどの自己免疫疾患の治療が可能であることを見出したのである。本発明はこうした知見に基づくものであり、I型糖尿病や慢性関節リウマチなどの自己免疫疾患を効果的に治療することができる、HSP60ファミリーに属するタンパク質の合成抑制剤を提供することを目的とする。

【0013】

【課題を解決するための手段】従って、本発明は、フラボノイドを有効成分として含有することを特徴とする、分子量57キログダルトンから68キログダルトンまでの間の熱ショックタンパク質(すなわち、HSP60ファミリーに属するタンパク質)の合成抑制剤に関する。本明細書において、「HSP60ファミリー」とは、前記のとおり、分子量が57kD~68kDの熱ショックタンパク質群を意味する。また、HSP60ファミリーに属

するタンパク質としては、例えば、HSP60(すなわち、分子量60kDの熱ショックタンパク質)、HSP58(すなわち、分子量58kDの熱ショックタンパク質)、HSP65(すなわち、分子量65kDの熱ショックタンパク質)、又はGrōEL(すなわち、原核生物、例えば、大腸菌などの分子量約64kDの熱ショックタンパク質)などを挙げることができる。

【0014】

【発明の実施の形態】以下、本発明について詳細に説明する。本発明の合成抑制剤の有効成分として含有されるフラボノイドは、特に限定されず、公知のフラボノイドを用いることができる。本発明の合成抑制剤において用いられるフラボノイドとしては、例えば、カルコン類、フラバノン類、フラボン類、フラボノール類、フラバノノール類、フラバノール類(カテキン類)、イソフラボン類、又はアントシアニン類等を挙げができる。フラボノイドは、単独で用いることもできるし、あるいは、異なる複数のフラボノイドを組み合わせて同時に用いるともできる。カルコン類としては、イソオカニン(Isookanin)、イソカルタミン(Isocarthamin)、イソサリップリン(Isosalipurpin)、イソブトリシン(Isobutrin)、イソリキリチン(Isoliquiritin)、オカニン(Okanin)、カルコン(Chalcone)、カルタミン(Carthamini)、コレオプシン(Coreopsin)、スチロプロシジン(Stillopsidin)、ネオサクラニン(Neosakuranin)、ブティン(Butein)、ペジシン(Pedicin)、ペジセリン(Pedecillin)、マレイン(Marein)、ランセオリン(Lanceolin)、又はランセオレチン(Lanceoletin)等が例示される。

【0015】フラバノン類としては、アルピネチン(Alpinetin)、イソカルタミジン(Isocarthamidin)、イソサクラニン(Isosakuranin)、イソサクラネチン(Isoakuranetin)、イソペジシン(Isopedicin)、エリオジクチオール(Eriodictyol)、カルタミジン(Carthamidin)、クリプトストロビン(Cryptostrobin)、サクラニン(Sakuranin)、サクラネチン(Sakuranetin)、サリップリン(Salipurpin)、ジヒドロオーゴニン(Dihydrowogonin)、シルトミネチン(Cyrtominetin)、ストロボピニン(Strobopinin)、ナリンギン(Naringin)、ナリングニン(Naringenin)、ネオカルタミン(Neocarthamin)、ネオヘスペリジン(Neohesperidin)、ピノストロビン(Pinostrobin)、ピノセンブリン(Pinocembrin)、ファルレロール(Farrerol)、ブチン(Butin)、ブトリン(Butrin)、フラバノオカニン(Flavanookanin)、フラバノマレイン(Flavanomarein)、フラバノランセオレチン(Flavanolanceoletin)、フラバノン(Flavanone)、フルニン(Prunin)、ヘスペリジン(Hesperidin)、ヘスペレチン(Hesperetin)、ベレクンジン(Verecundin)、ホモエリオジクチオール(Homoeriodictyo 50 1)、ポンシリシン(Poncirus)、マットイシノール(Matt 1)、ポンシリシン(Poncirus)、マットイシノール(Matt 1)

eucinol)、リキリチゲニン (Liquiritigenin)、又はリキリチン (Liquiritin) 等が例示される。

【0016】フラボン類としては、アカシン (Acacian)、アカセチン (Acacetin)、アピイン (Apiin)、アピゲニン (Apigenin)、オーゴニン (Wogonin)、オロキシリジン-A (Oroxylin-A)、ガルテオリン (Galuteolin)、クリシン (Chrysin)、クリソエリオール (Chrysoreiol)、グルコルテオリン (Glucoluteolin)、ゲンカニン (Genkwanin)、コスマシイン (Cosmosiin)、ジオスミン (Diosmin)、ジオスメチン (Diosmetin)、スクテラリン (Scutellarin)、スクテラレイン (Scutellarein)、ストロボクリシン (Strobochrysin)、テクトクリシン (Tectochrysin)、トリシン (Tricin)、トリンギン (Toringin)、ノビレチン (Nobiletin)、バイカリン (Baicalin)、バイカレイン (Baicalein)、フラボン (Flavone)、プリメチン (Primetin)、ペクトリナリゲニン (Pectolinarigenin)、ペクトリナリン (Pectolinarin)、ペダリイン (Pedaliin)、ペダリチン (Pedalitin)、ポンカネチン (Ponkanetin)、リナリン (Linarin)、ルテオリン (Luteolin)、ロイホリン (Rhoifolin)、ロツシン (Lotusin)、又はロトフラビン (Lotoflavin) 等が例示される。

【0017】フラボノール類としては、アザレアチン (Azaleatin)、アザレイン (Azalein)、アストラガリン (Astragalin)、アビクラリン (Avicularin)、アフゼリン (Afzelin)、アヤニン (Ayanin)、イカリイン (Icarinin)、イカリチン (Icaritin)、イザルピニン (Izalpinin)、イソケルシトリシン (Isoquercitrin)、イソラムネチン (Isorhamnetin)、エリアンチン (Erianthin)、オーラネチン (Auranetin)、カヌギン (Kanugin)、ガランギン (Galangin)、カラニジン (Karanjin)、ガルデニン (Gardenin)、カンナビスシトリシン (Cannabiscitrin)、キサントラムニン (Xanthorhamnin)、クリソスプレネチン (Chrysosplenitin)、ケルシツロン (Quercitron)、ケルシトリシン (Quercitrin)、ケルシメリトリシン (Quercimeritin)、ケルセタギトリシン (Quercetagetrin)、ケルセタゲチン (Quercetagetrin)、ケルセチン (Quercetin)、ケヤキニン (Keyakinin)、ケンフェリド (Kaempferid)、ケンフェリトリン (Kaempferitin)、ケンフェロール (Kaempferol)、ゴッシピトリン (Gossypitrin)、ゴッシピン (Gossypin)、ゴッシペチン (Gossypetin)、スピレオシド (Spiraeoside)、ダチスセチン (Datiscetin)、タプシン (Thapsin)、タンゲリチン (Tangeritin)、タンブリン (Tambulin)、タンブレチン (Tambuletin)、テルナチン (Ternatin)、トリホリン (Trifolin)、ナルシッシン (Narcissin)、ノルイカリイン (Noricariin)、ノルイカリチン (Noricaritin)、パツレチン (Patuletin)、ヒビスシトリシン (Hibiscitrin)、ヒビスセチン (Hibiscetin)、ヒペリン (Hypelin)、フィセチン (Fisetin)、フラボノール (Flavonol)

1)、ペルシカリン (Persicarin)、ヘルバシトリシン (Herbacitrin)、ヘルバセチン (Herbacetin)、ミケリアニン (Miquelianin)、ミリシトリシン (Myricitrin)、ミリセチン (Myricetin)、メラチン (Meratin)、メリシンプリン (Melisimplin)、メリシンプレキシン (Melisimplesxin)、メリテルナチン (Meliernatin)、メリテルニン (Meliernin)、モリン (Morin)、ラムナジン (Rhamnazin)、ラムネチン (Rhamnetin)、ラムノシトリシン (Rhamnocrin)、ルチン (Rutin)、レイノウトリシン (Reynoutrin)、ロビニン (Robinin)、又はロビネチン (Robinetin) 等が例示される。

【0018】フラバノール類としては、アスチルビン (Astilbin)、アルビノン (Alpinon)、アロマデンドリン (Aromadendrin)、アンペロプチソ (Ampeloptin)、イソエンゲリチン (Isoengelitin)、エンゲリチン (Engelitin)、ケヤキノール (Keyakinol)、ジヒドロロビネチン (Dihydrorobinetin)、ストロボバンクシン (Strobobanksin)、タキシホリン (Taxifolin)、ピノバンクシン (Pinobanksin)、フェラムリン (Phellamurin)、フェラムレチン (Phellamuretin)、又はフスチン (Fustin) 等が例示される。

【0019】フラバノール類 (カテキン類) としては、アフゼレキン (Afzelechin)、エピアフゼレキン (Epiafzelechin)、エピカテキン (Epicatechin)、エピカテキンガレート (Epicatechin gallate)、エピガロカテキン (Epigallocatechin)、エピガロカテキンガレート (Epigallocatechin gallate)、カテキン (Catechin)、カテキンガレート (Catechin gallate)、ガロカテキン (Gallocatechin)、又はガロカテキンガレート (Gallocatechin gallate) 等が例示される。

【0020】イソフラボン類としては、イソフラボン (Isoflavon)、イリゲニン (Iridenin)、イリジン (Iridin)、オサジン (Osajin)、オノニン (Ononin)、ゲニスチン (Genistin)、ゲニステイン (Genistein)、サンタール (Santal)、ソホラビオシド (Sophorabioside)、ソホリコシド (Sophoricoside)、ダイジン (Daidzin)、ダイゼイン (Daidzein)、テクトリゲニン (Tectorigenin)、テクトリジン (Tectoridin)、ビオカニン A (Biochanin A)、ブソイドバプチゲニン (Pseudobaptigenin)、ブソイドバプチシン (Pseudobaptisin)、ブルヌセチン (Prunusetin)、ブルネチン (Prunetin)、ポミフェリン (Pomiferin)、又はホルムオノネチン (Formononetin) 等が例示される。

【0021】アントシアニン類としては、アオバニン (Awabanin)、イデイン (Idaein)、イリシシアニン (Iliccyanin)、エニン (Ennin)、クリサンテミン (Chrysanthemin)、ゲスネリン (Gesnerin)、ゲスネリジン (Gesneridin)、ケラシアニン (Keracyanin)、サルビアニン (Salvianin)、シアニジン (Cyanidin)、シアニン (Cyanin)、デルフィニジン (Delphinidin)、デルフィニン

(Delphinin)、デルフィン (Delphin)、ネグレテイン (Negretein)、ビオラニン (Violanin)、ヒルスチジン (Hirsutidin)、ヒルスチン (Hirsutin)、プリムリン (Primulin)、ブルニシアニン (Prunicyanin)、ペオニジン (Paeonidin)、ペオニン (Paeonin)、ペツニジン (Petunidin)、ペツニン (Petunin)、ペラルゴニジン (Pelargonidin)、ペラルゴニン (Pelargonin)、マルビジン (Malvidin)、又はマルビン (Malvin) 等が例示される。

【0022】本発明の合成抑制剤において用いられるフラボノイドとしては、特に好ましくは、ケルセチン〔すなわち、2-(3,4-ジヒドロキシフェニル)-3,5,7-トリヒドロキシ-4H-1-ベンゾピラン-4-オン〕、ルチン(すなわち、ケルセチン-3-ールチノシド)、バイカレイン(すなわち、5,6,7-トリヒドロキシ-2-フェニル-4H-1-ベンゾピラン-4-オン)、又はカテキン類を挙げることができる。本発明の合成抑制剤において有効成分として用いるカテキン類としては、(+) カテキン、(+) ガロカテキン、(+) カテキンガレート、(+) ガロカテキンガレート、(-) エピカテキン、(-) エピガロカテキン、(-) エピカテキンガレート、(-) エピガロカテキンガレートが好ましい。なお、本発明の合成抑制剤において有効成分として用いるフラボノイドとしては、純粹な立体異性体又はそれらの混合物を用いることができる。

【0023】本発明の合成抑制剤に含有されるフラボノイドは、化学合成によって、又は天然物から抽出して精製することによって、調製することができる。あるいは、市販品を用いてもよい。また、本発明の合成抑制剤において有効成分として用いるカテキン類は、主に茶カテキン類として知られており、天然物から抽出して精製する場合、これに限定するものではないが、茶から抽出することが好ましい。

【0024】前記のように、茶には茶カテキン類が含まれているので、茶抽出物を本発明の合成抑制剤の有効成分として用いることもできる。本明細書において「茶」とは、茶 [Camellia sinensis, (L.) O. Kuntze] の全草若しくはその一部分、例えば葉、木部、根、実等の生若しくは乾燥物のそのまま若しくは部分発酵物又は完全発酵物を意味し、これらの部分を単独で、又は任意に組み合わせて使用することができる。抽出原料として茶葉を用いる場合、各種形態のものがあり、たとえば茶生葉から仕上げ茶(乾燥茶)まで、通常の製茶工程のいずれの段階のものでもよく、かつ発酵の程度に関係なく、紅茶などの発酵茶、ウーロン茶などの半発酵茶、緑茶などの不発酵茶のいずれをも使用することができる。

【0025】本発明による合成抑制剤の有効成分である茶抽出物は、前記の茶カテキン類を含有していればよく、従って、茶の粗抽出物を用いることができる。この

茶粗抽出物は、茶を温水(好ましくは熱湯)によって抽出するか、又は有機溶媒を用いて抽出することにより、得ることができる。有機溶媒としては、例えば、メチルアルコール、エチルアルコール、n-プロピルアルコール、イソプロピルアルコール、若しくはブチルアルコール等の低級アルコール、酢酸メチル、酢酸エチル、酢酸プロピル、若しくは酢酸ブチル等の低級エステル、又はアセトン、若しくはメチルイソブチルケトン等のケトン類を用いることができ、これらの有機溶媒を単独又は適宜組み合わせ、更には無水又は好ましくは含水状態で用いることができる。

【0026】水抽出及び有機溶媒抽出の方法としては、通常の生薬抽出に用いられる方法を用いることができ、例えば、(乾燥) 茶葉1重量部に対し、水又は有機溶媒5~20重量部を用いて、攪拌しながら、その沸点以下の温度で加熱還流することが望ましい。抽出工程は、通常は5分~7日間、好ましくは10分~24時間実施し、必要に応じて、攪拌等の補助的手段を加えることにより、抽出時間を短縮することができる。水又は有機溶媒抽出液は、沪過又は遠心分離等の適当な方法により、不溶物を分離することができる。常法による热水抽出物又は有機溶媒抽出物の他に、これらの抽出液を各種有機溶媒又は吸着剤等により、更に処理した生成物も、本発明の合成抑制剤の有効成分として用いることができる茶抽出物に含まれる。これらの茶抽出物は、必要に応じて、濃縮や乾燥して粉末化したり、更には冷水より結晶化して精製することができる。

【0027】こうして得られた茶抽出物は、茶(特に茶葉)に含まれるカテキン類、すなわち、茶カテキン類(例えば、カテキン、エピカテキン、ガロカテキン、エピガロカテキン、カテキンガレート、エピカテキンガレート、エピガロカテキンガレート、又はガロカテキンガレート)を混合物として含み、同時に原料茶に由来する不純物を含んでいる。

【0028】本発明の合成抑制剤は、前記のケルセチン、ルチン、バイカレイン、若しくはカテキン類等のフラボノイド又は茶抽出物を、それ単独で、又は好ましくは製剤学的若しくは獣医学的に許容することのできる通常の担体と共に、動物、好ましくは哺乳動物(特にヒト)に投与することができる。投与剤型としては、特に限定がなく、例えば、散剤、細粒剤、顆粒剤、錠剤、カプセル剤、懸濁液、エマルジョン剤、シロップ剤、エキス剤、若しくは丸剤等の経口剤、又は注射剤、外用液剤、軟膏剤、坐剤、局所投与のクリーム、若しくは点眼薬などの非経口剤を挙げることができる。これらの経口剤は、例えば、ゼラチン、アルギン酸ナトリウム、澱粉、コーンスター、白糖、乳糖、ぶどう糖、マンニット、カルボキシメチルセルロース、デキストリン、ポリビニルピロリドン、結晶セルロース、大豆レシチン、ショ糖、脂肪酸エステル、タルク、ステアリン酸マグネシ

11

ウム、ポリエチレングリコール、ケイ酸マグネシウム、無水ケイ酸、又は合成ケイ酸アルミニウムなどの賦形剤、結合剤、崩壊剤、界面活性剤、滑沢剤、流動性促進剤、希釈剤、保存剤、着色剤、香料、矯味剤、安定化剤、保湿剤、防腐剤、酸化防止剤等を用いて、常法に従って製造することができる。例えば、カテキン1重量部と乳糖99重量部とを混合して充填したカプセル剤などである。

【0029】非経口投与方法としては、注射（皮下、静脈内等）、又は直腸投与等が例示される。これらのなかで、注射剤が最も好適に用いられる。例えば、注射剤の調製においては、有効成分としてのフラボノイドの他に、例えば生理食塩水、リンゲル液等の水溶性溶剤、植物油、脂肪酸エステル等の非水溶性溶剤、ブドウ糖、塩化ナトリウム等の等張化剤、溶解補助剤、安定化剤、防腐剤、懸濁化剤、乳化剤等を任意に用いることができる。具体的に一例を示すと、(+) カテキン10mgとマンニトール50mgを蒸留水に溶解して10mlとし、常法で除菌した後、2mlずつを注射用小瓶に分注し、又はそのまま凍結乾燥して注射剤とする。使用に際して、生理食塩水で希釈して注射液とする。また、本発明の合成抑制剤は、徐放性ポリマーなどを用いた徐放性製剤の手法を用いて投与してもよい。例えば、本発明の合成抑制剤をエチレンビニル酢酸ポリマーのペレットに取り込ませて、このペレットを治療すべき組織中に外科的に移植することができる。

【0030】本発明の合成抑制剤は、これに限定されるものではないが、フラボノイド又はその医薬上許容される塩を0.01～99重量%、好ましくは0.1～80重量%の量で含有することができる。また、茶抽出物を有効成分として含有する本発明の合成抑制剤は、その中に含まれるフラボノイドが前記の量範囲になるように適宜調整して、調製することができる。なお、茶抽出物を有効成分として含有する合成抑制剤を、経口投与用製剤とする場合には、製剤学的に許容することのできる担体を用いて、製剤化することが好ましい。本発明の合成抑制剤を用いる場合の投与量は、病気の種類、患者の年齢、症状の程度、投与方法などにより異なり、特に制限はないが、フラボノイド量として通常成人1人当たり1mg～10g程度を、1日1～4回程度にわけて、経口的に又は非経口的に投与する。更に、用途も医薬品に限定されるものではなく、種々の用途、例えば、機能性食品や健康食品として飲食物の形で与えることも可能である。

【0031】なお、本発明の合成抑制剤に用いられるフラボノイドのうち、ケルセチンの急性毒性(LD_{50})は、マウス経口投与の場合、160mg/kgであり（ザ・メルク・インデックス、11版、メルク社、1278頁）、ルチンの急性毒性(LD_{50})は、マウス静脈注射の場合、950mg/kgである（ザ・メルク・イ

12

ンデックス、11版、メルク社、1319頁）。また、本発明の合成抑制剤に用いる茶カテキン類に毒性は特に認められなかった。

【0032】

【作用】上記したように、本発明の合成抑制剤に含有されるフラボノイドは、細胞内のHSP60ファミリーに属するタンパク質の合成を特異的に抑制する作用があるので、前記フラボノイドを投与すると細胞でのHSP60ファミリーに属するタンパク質の生合成が特異的に減少する。従って、前記フラボノイドは、HSP60ファミリーに属するタンパク質がその発症に関連する自己免疫疾患、例えばI型糖尿病や慢性関節リウマチなどの予防及び治療に使用することができる。

【0033】

【実施例】以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

実施例1：ヒト培養癌細胞のHSP発現量の測定

(1) ヒト培養癌細胞の培養

20 以下の各種ヒト培養癌細胞を、5%二酸化炭素条件下で、熱ショック処理時以外は、37°Cで培養した。乳癌細胞株MCF7(ATCC HTB 22)、及び前立腺癌細胞株DU 145(ATCC HTB 81)は、10%非動化ウシ胎児血清（以下、FBSと略称する）を含む RPMI 1640培地で培養した。MCF7の培地には 10^{-8} Mβ-エストラジオールを添加した。子宮癌細胞株HeLa S3(ATCC CCL 2.2)、及び腎癌細胞株ACHN(ATCC CRL 1611)は、10%非動化FBSを含むMEM培地にて培養した。前立腺癌細胞株PC-3(ATCC CRL-145)は、7%非動化FBSを含むF-12K培地（シグマ、カタログ番号N-3520）にて培養した。

30 【0034】(2) フラボノイド処理及び熱ショック処理
播種2日後の前記各種培養ヒト癌細胞の培地中に、以下のフラボノイドの内のいずれか1つを添加し、24時間培養した。用いたフラボノイドの添加後の培地中での濃度は、ケルセチン（ナカライトスク、カタログ番号298-40 12） $100\mu M$ 、ルチン（ナカライトスク、カタログ番号303-19） $100\mu M$ 、カテキン[(+)-Catechin；フナコシ Code No. 0952: EXTRASYNT HESE社製、フランス] $100\mu M$ 、バイカレイン（松浦薬業） $20\mu M$ であった。その後、45°Cにて15分間熱ショック処理をしてから、37°Cにて終夜培養した。対照試験は、フラボノイドを添加しないこと以外は前記と同様に実施した。
40 【0035】(3) ヒト培養癌細胞でのHSP発現量の測定
50 前項(2)で処理した各細胞を、以下に示す方法により

ホモジナイズし、HSP発現量をウェスタンプロット法にて測定した。すなわち、前項(2)で処理した細胞を、リン酸緩衝生理食塩水〔組成：KC1=0.2g/1, KH₂PO₄=0.2g/1, NaCl=8g/1, Na₂HPO₄(無水)=1.15g/1;以下、PBS(-)と称する〕で洗浄した後、ライシスバッファー〔lysis buffer〕〔1.0%NP-40、0.15M塩化ナトリウム、50mMトリス-HCl(pH8.0)、5mM-EDTA、2mM-N-エチルマレイミド、2mMフェニルメチルスルホニルフルオリド、2μg/mlロイペプチド及び2μg/mlペプチダーゼ〕1mlを加え、氷上で20分間静置した。その後、4°Cで12000rpmにて、20分間、遠心を行った。遠心後の上清10μlをPBS(-)790μlに加え、更にプロテインアッセイ染色液(Dye Reagent Concentrate：バイオラッド、カタログ番号500-0006)200μlを加えた。5分間、室温にて静置した後、595nmで吸光度を測定してタンパク質定量を行った。

【0036】タンパク質定量を行った試料を用いて、Laemmliのバッファー系(Laemmli, N. K., "Nature", 238: pp. 249-256, 1970)にて、等量のタンパク質を含むライセートのSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。電気泳動後、プロッティング及びそれに続くブロッキングを行った。すなわち、タンパク質転写装置(Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell:バイオ・ラッド、カタログ番号170-3946)を用いて、室温にて100Vにて、0.45μmニトロセルロース膜(Schleicher & Schuell、カタログ番号401196)にゲルを密着させ、3時間プロッティングを行った。プロッティングバッファーとしては、0.025Mトリス及び0.192MグリシンよりなりpH8.5に調整されたトリスグリシンバッファー(Tris Gly Running and Blotting Buffer; Enprotech, 米国マサチューセッツ州、カタログ番号SA100034)にメチルアルコールを20%になるように加えて調製したバッファーを用いた。プロッティング後、ニトロセルロース膜を10%スキムミルク(雪印乳業)-PBS(-)溶液に室温にて30分間、インキュベートし非特異的結合をブロックした。

【0037】ブロッキング後、ニトロセルロース膜の上で、抗ヒトHSP60マウスモノクローナル抗体(Stre*

| 癌種 | 癌細胞 | ケルセチン | ルチン | カテキン | バイカレイン |
|-----|---------|-------|-----|------|--------|
| 子宮 | HeLa S3 | ↓ | | | |
| 腎臓 | A CHN | | ↓ | | |
| 前立腺 | DU 145 | ↓ | | | |
| 前立腺 | PC-3 | ↓ | | | |
| 乳 | MCF 7 | ↓ | ↓ | ↓ | |

【0040】対照試験、すなわち、フラボノイドを添加しなかった細胞では、分子量約60kDのバンドが一本検出された。なお、分子量は、前記抗ヒトHSP60マウスモノクローナル抗体との結合、及び分子量マーカー(卵白オバルブミン及びウシ血清アルブミン)により決定した。表1に示すとおり、カテキンは、腎臓癌細胞株

*ssGen, Victoria, B.C., Canada, カタログ番号SPA-806)により、1次抗体反応を行った。この抗ヒトHSP60マウスモノクローナル抗体は、大腸菌を用いるリコンビナントDNA法により作製したヒトHSP60を免疫原として作製した抗体であり("J. Exp. Med." 175, 1805-1810, 1992)、哺乳類HSP60(靈長類HSP60、マウスHSP60、ラットHSP60、及びハムスターHSP60)と特異的に反応する("J. Exp. Med." 175, 1805-1810, 1992)。この抗ヒトHSP60マウスモノクローナル抗体が認識するエピトープは、ヒトHSP60アミノ酸配列の第383番目～第447番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列中に局在する("J. Exp. Med." 175, 1805-1810, 1992)。1次抗体反応後、PBS(-)で5分間ずつ、溶液を取り替えて2回の洗浄をスロー・ロッキング・シェイカーによって行い、更にPBS(-)0.1%Tween20(バイオ・ラッド、カタログ番号170-6531)溶液で15分間ずつ、溶液を取り替えて4回の洗浄を行った。最終的に、PBS(-)で5分間ずつ、2回の洗浄を行った。

【0038】洗浄終了後、ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウスIgG抗体(CAPPEL、カタログ番号55550)を、2%スキムミルクを含むPBS(-)溶液で5000倍に希釈して調製した抗体溶液5mlを用いて、2時間、2次抗体反応を行った。反応終了後、ニトロセルロース膜に関して、PBS(-)溶液で5分間ずつ溶液を変えて2回、更にPBS(-)0.1%Tween20溶液で15分間ずつ溶液を変えて5回の洗浄をスロー・ロッキング・シェイカーにより行った。最後にPBS(-)溶液で5分間ずつ2回の洗浄を行った。余分なPBS(-)溶液を除去した後、ウェスタンプロッティング検出試薬(ECL Western blotting detection reagent; Amersham、カタログ番号RPN2106)をニトロセルロース膜上に振りかけ、1分間インキュベートした後、余分な検出試薬を除去し、ニトロセルロース膜をラップに包み、反応面をX線フィルム(コダック X-OMAT, AR、カタログ番号165 1454)に密着させて露光し、現像してHSP60の有無の検討を行った。結果を表1に示す。表中、「↓」は、対照に比べて、HSP60発現量が減少することを意味する。

【0039】

【表1】

※ウスモノクローナル抗体との結合、及び分子量マーカー(卵白オバルブミン及びウシ血清アルブミン)により決定した。表1に示すとおり、カテキンは、腎臓癌細胞株

15

A C H N 及び乳癌細胞株M C F 7においてH S P 6 0の発現を抑制した。ケルセチンは、子宮癌細胞株H e L a S 3、前立腺癌細胞株D U 1 4 5、前立腺癌細胞株P C - 3、及び乳癌細胞株M C F 7においてH S P 6 0の発現を抑制した。ルチンは、乳癌細胞株M C F 7においてH S P 6 0の発現を抑制した。バイカレインは、前立腺癌細胞株D U 1 4 5においてH S P 6 0の発現を抑制した。すなわち、カテキン、ケルセチン、ルチン、及びバイカレインは、H S P 6 0の発現を抑制する合成抑制剤の活性を有するものと結論することができる。

10

16

【0041】

【発明の効果】以上詳述したように、フラボノイドは細胞内のH S P 6 0 ファミリーに属するタンパク質の発現を抑制する合成抑制剤の活性を有する。従って、フラボノイドを投与することにより、例えば、H S P 6 0 ファミリーに属するタンパク質が発症に関与する自己免疫疾患（例えば、I型糖尿病や慢性関節リウマチなど）の患者の生理学的状態を有效地に改善させ、前記病気を効果的に治療することができる。

フロントページの続き

(51) Int.C1.⁶

識別記号 庁内整理番号

F I

技術表示箇所

C O 7 D 311/32

C O 7 D 311/32

311/62

311/62

C O 7 H 17/065

C O 7 H 17/065